



In vitro biological activities of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves extract

Eun Jung Park¹ · Hye Won Cho¹ · Yu Jin Park¹ · Man-Jin In¹ · Dong Chung Kim¹

연잎(*Nelumbo nucifera*) 추출물의 in vitro 생리활성

박은정¹ · 조혜원¹ · 박유진¹ · 인만진¹ · 김동청¹

Received: 22 March 2021 / Accepted: 19 April 2021 / Published Online: 30 June 2021
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2021

Abstract Antioxidative, anticoagulant, and α -glucosidase inhibitory effects of 60% (v/v) ethanolic extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves were investigated *in vitro*. The yield and polyphenol content of the lotus leaves extract were $35.3 \pm 1.1\%$ and $186.2 \pm 5.2 \mu\text{g}$ gallic acid equivalents/mg, respectively. The lotus leaves extract effectively scavenged free and cation radicals, and nitrite in a concentration-dependent manner, and possessed potent reducing power. The lotus leaves extract had remarkable anticoagulant and α -glucosidase inhibitory activities as a function of the extract concentration.

Keywords Anticoagulant · Antioxidative · α -Glucosidase inhibitory · Lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves · Polyphenol

서 론

연(*lotus*, *Nelumbo nucifera*)은 부엽식물로 온대 지역에서 열대 지역까지 폭넓게 자생하고 있고, 예부터 우리나라를 포함하는 동아시아에서 식품 재료 및 민간치료제로 널리 사용되어 왔다 [1]. 연은 식용으로 이용되는 부위인 잎, 꽃, 뿌리줄기(연근) 및

씨앗(연자육)에 항균, 항산화 및 항비만 등의 효과를 지닌 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있다[2-6].

특히 식품 원료로 널리 사용되는 연잎에는 폴리페놀, 카로티노이드, 플라보노이드, 비타민류, 알칼로이드 등의 화합물이 풍부하게 함유되어 있어 다양한 약리 효과를 나타낸다[7]. 연잎의 알칼로이드인 roemerine과 nuciferine 등은 진정 및 진통 작용을 가지고 있고, 항산화 비타민인 카로틴, 비타민 C, 토코페롤은 유리라디칼을 제거함으로써 심혈관계 질환과 노화를 방지하는 효과를 보인다[8]. 또한 연잎의 플라보노이드는 항산화 효소인 superoxide dismutase, glutathione peroxide, catalase의 활성을 증가시키고 지질 과산화를 억제하며[9,10], 연잎의 폴리페놀은 항산화[11] 및 항균 효과[8,12]를 가지는 것으로 알려졌다. 연잎 추출물은 멜라닌 색소의 생성을 억제하고 자외선에 의한 피부 노화를 방지하는 효과도 있다[13,14].

이러한 다양한 효능으로 인해 연잎은 식품 소재뿐만 아니라 차로도 음용하고 화장품 소재로도 널리 이용되고 있다. 본 연구에서는 연잎을 식품산업에서 추출용매로 허용된 에탄올 수용액으로 추출한 후 폴리페놀 함량, 유리라디칼 및 양이온라디칼 소거활성, 환원력, 아질산염 소거활성을 종합적으로 평가함으로써 연잎의 항산화 효과에 관한 기존의 연구[9-11]를 보완하고자 하였고, 또한 연잎 추출물의 혈장 항응고 활성과 α -glucosidase 저해활성을 확인함으로써 연잎을 다양한 생리활성 소재로 용도 확대하는데 기여하고자 하였다.

Dong Chung Kim (✉)
E-mail: kimdc@chungwoon.ac.kr

¹Department of Chemical Engineering, Chungwoon University, Incheon 22100, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

실험재료

연잎은 강원도 홍천에서 재배한 것의 건조 분말(Oherb사, Seoul, Republic of Korea)을 구입하여 200 mesh sieve로 거른 후 사용하였다. Folin 시약, gallic acid, 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline)-sulfonic acid

(ABTS), sodium nitrite, potassium ferricyanide, ferric chloride, L-ascorbic acid, *p*-nitrophenol- α -D-glucose (PNPG) 및 α -glucosidase는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. Human normal plasma, thromboplastin 시약, aPTT-XL 용액 및 thrombin은 Thermo Fisher Scientific사(Middletown, VA, USA)의 제품을, 이외의 시약은 1급 이상을 사용하였다.

연잎의 에탄올 수용액 추출 및 폴리페놀 함량

연잎 분말에 40배(w/v)의 60% (v/v) 에탄올 수용액을 가하고 50 °C에서 2시간 진탕 추출한 다음 원심분리(3,000×g, 10분)하여 얻어진 상등액을 여과지로 거른 후 회전감압농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)로 농축하여 연잎 추출물을 얻었다. 연잎 추출물의 폴리페놀 함량은 연잎 추출물에 Folin 시약을 넣고 실온에서 5분 반응시킨 다음 10% sodium carbonate 용액을 가하고 60분 후 725 nm에서 흡광도를 측정하여 표준물질인 gallic acid 당량으로 나타내었다[15].

연잎 추출물의 항산화 활성

연잎 추출물의 양이온라디칼 소거활성은 7.5 mM ABTS와 2.5 mM potassium persulfate의 혼합 용액을 만들어 어두운 곳에서 15시간 방치한 후 414 nm의 흡광도를 1.500±0.05로 조정된 ABTS 용액을 연잎 추출물에 첨가하여 실온에서 90분 반응시킨 다음 414 nm의 흡광도로 확인하였다[16]. 유리라디칼 소거활성은 연잎 추출물에 0.2 mM DPPH 용액을 첨가하여 실온에서 30분 반응시킨 다음 517 nm의 흡광도로 확인하였다[17]. 아질산염 소거활성은 0.2 M 구연산 완충용액(pH 1.2)에 연잎 추출물과 1 mM sodium nitrite를 넣고 37 °C에서 60분 반응시킨 다음 Griess 시약을 첨가하여 실온에서 20분 정치한 후 520 nm의 흡광도로 확인하였다[18]. 환원력은 0.2 M 인산 완충용액(pH 6.8)에 연잎 추출물과 1% potassium ferricyanide (III)를 넣고 50 °C에서 20분 반응시킨 다음 10% trichloroacetic acid를 처리하고 원심분리(3,000×g, 10분)하여 얻어진 상등액에 0.1% ferric chloride를 넣은 후 700 nm의 흡광도로 확인하였다[19]. 라디칼과 아질산염에 대한 소거활성(%)은 $[1 - (\text{추출물 첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도})] \times 100$ 으로 계산하였고, 환원력은 흡광도의 증가로 확인하였다. 항산화 활성은 대조물질인 L-ascorbic acid와 비교하였다.

연잎 추출물의 혈장 항응고 및 α -glucosidase 저해 활성

연잎 추출물의 혈장 항응고 활성은 혈액응고분석기(CM2, Behnk Elektronik, Norderstedt, Germany)로 응고 시간의 지연 정도를 측정하였다. Activated partial thromboplastin time (aPTT)은 혈장에 연잎 추출물과 aPTT-XL 용액을 혼합하여 37 °C에서 3분간 전처리한 후 20 mM CaCl₂를 넣어 측정하였고, prothrombin time (PT)은 연잎 추출물과 혈장을 혼합하여 37 °C에서 3분간 전처리한 후 thromboplastin 용액을 넣어 측정하였으며,

thrombin time (TT)은 혈장에 연잎 추출물과 20 mM CaCl₂를 혼합하여 37 °C에서 3분간 전처리한 후 0.5 U thrombin을 넣고 응고시간을 측정하였다[20].

연잎 추출물의 α -glucosidase 저해활성은 0.2 M 인산 완충용액(pH 6.8)에 연잎 추출물과 0.4 U α -glucosidase를 넣고 37 °C에서 10분간 전처리한 후 3 mM PNPG를 넣고 37 °C에서 10분간 반응시키고 0.1 M sodium carbonate를 첨가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[21].

결과 및 고찰

연잎 추출물의 수율 및 폴리페놀 함량

연잎을 60% (v/v) 에탄올 수용액으로 추출하여 얻어진 연잎 추출물의 수율은 35.3±1.1%이었고, 폴리페놀 함량은 186.2±5.2 μ g gallic acid equivalents (GAE)/mg-추출물로 나타났다(Table 1). 식물체가 만들어내는 폴리페놀 화합물은 페놀류, 페놀산류, 플라보노이드류 및 탄닌류 등을 포함하는 대표적인 활성 물질로 항산화, 항균 및 항혈전 등의 생리효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[22,23]. 또한 폴리페놀 화합물의 함량은 항산화 활성 등의 생리활성과 밀접한 상관 관계가 있는 것으로 보고된 바 있다[24]. 연잎 추출물의 폴리페놀 함량은 연의 다른 부위인 연자방, 연자육, 연근, 우절 추출물보다 월등히 높다는 보고[25]가 있고, 기존의 약용식물로 알려진 모시잎 추출물의 105.0 μ g/mg [26], 두충잎 추출물의 64.1 μ g/mg [27], 사자발약쑥 추출물의 106.9 μ g/mg [28] 및 녹차 추출물의 85.6 μ g/mg [29] 보다 높은 것으로 나타나 연잎 추출물의 우수한 생리활성을 기대할 수 있었다.

연잎 추출물의 항산화 활성

연잎 추출물은 농도에 비례하여 DPPH 유리라디칼과 ABTS 양이온라디칼을 소거하였다(Fig. 1A). 체내에서 생성되는 라디칼은 반응성이 매우 강하여 생체 필수 성분인 핵산, 단백질, 지질의 산화적 손상을 야기함으로써 돌연변이, 암 및 다양한 성인병의 원인이 되는데[30] 연잎 추출물은 유리라디칼과 양이온라디칼을 효과적으로 소거하였다. 라디칼의 절반을 소거하는 농도를 EC₅₀값으로 하였고, 연잎 추출물의 DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼에 대한 EC₅₀값은 각각 205.1 및 274.1 μ g/mL로 나타났다. 이는 기존 연구에서 연잎의 50 및 75% 에탄올 추출물의 DPPH 유리라디칼에 대한 EC₅₀값이 각각 170 및 130 μ g/mL로 보고[7]된 것과 큰 차이가 없었다. 또한 다른 약용식물과 비교하였을 때, 두충잎 추출물의 DPPH와 ABTS 라디칼에 대한 EC₅₀값이 각각 574.2 및 560.6 μ g/mL인 것[27]에 비해서는 크게 낮았고, 사자발약쑥 추출물의 DPPH와 ABTS 라디칼에 대한 EC₅₀값이 각각 297.1 및 226.1 μ g/mL인 것[28]과는 비슷한 수준으로 나타나 연잎 추출물은 유리라디칼과 양이온라디칼을

Table 1 Yield and polyphenol content of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves extract

Yield (%)	polyphenol content ²⁾ (μ g GAE/mg-extract)
35.3±1.1 ¹⁾	186.2±5.2 ¹⁾

¹⁾Data represented means and SD of triplicate measurements

²⁾Polyphenol content was expressed as gallic acid equivalents (GAE)

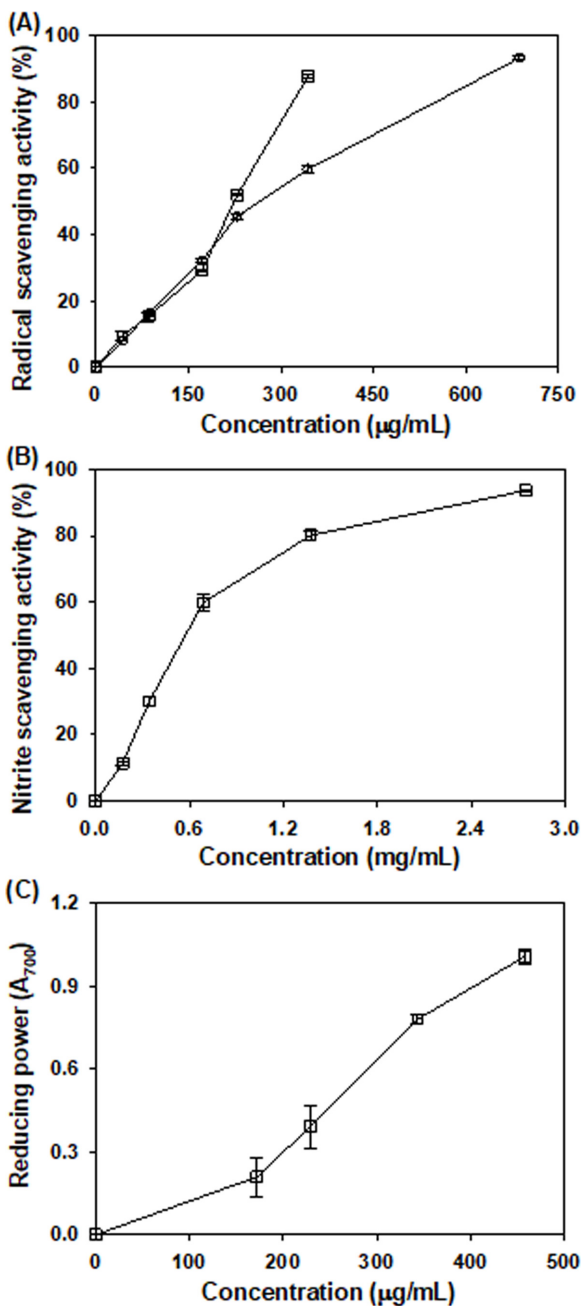


Fig. 1 (A) DPPH free radical (-□-) and ABTS cation radical (-○-) scavenging, and (B) Nitrite scavenging activities, and (C) Reducing power of 60% ethanolic extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves. Data were means and SD of triplicate measurements

소거하는 항산화 능력이 우수함을 알 수 있었다.

연잎 추출물은 농도의존적으로 아질산염을 소거하였다(Fig. 1B). 음식물을 통해 섭취된 아질산염은 위의 강산 조건에서 아민류와 반응하여 nitrosamine을 생성함으로써 발암성을 가지게 되는데[31] 연잎 추출물의 항산화 물질은 아질산염을 효과적으로 소거하는 것으로 나타났다. 연잎 추출물의 아질산염을 절반 소거하는 농도인 EC₅₀값은 580.3 µg/mL로 나타났다. 이는 약용

식물인 두충잎과 사자발약쑥의 추출물의 아질산염 소거에 대한 EC₅₀값이 각각 2,329.2 [27] 및 976.1 µg/mL [28]인 것에 비해 매우 낮게 나타나 연잎 추출물의 아질산염 소거 능력은 매우 우수한 것으로 판단된다.

또한 연잎 추출물의 농도가 증가할수록 그에 비례하여 환원력도 증가하였다(Fig. 1C). 연잎 추출물은 산화된 Fe³⁺ 이온에 전자를 공여하여 Fe²⁺로 환원시키는 항산화 능력이 우수하였다. 환원력의 EC₅₀값은 흡광도가 0.5에 이르는데 필요한 농도로 하였고, 연잎 추출물의 환원력에 대한 EC₅₀값은 238.1 µg/mL로 나타났다. 이는 약용식물로 알려진 두충잎과 뽕나무 추출물의 EC₅₀ 값이 319.9 [27] 및 500 µg/mL [32]인 것과 복분자와 오디 열매 추출물의 EC₅₀값이 871.0 및 746.0 µg/mL [33]인 것에 비해 매우 낮았고, 사자발약쑥 추출물의 EC₅₀값인 178.6 µg/mL [28]인 것보다는 다소 높은 수준으로 나타나 연잎 추출물의 환원력은 우수하다고 여겨진다.

연잎 추출물의 다양한 항산화 활성을 대조물질인 L-ascorbic acid와 비교하였을 때, L-ascorbic acid의 DPPH 라디칼, ABTS 라디칼, 아질산염 및 환원력에 대한 EC₅₀값이 각각 63.6, 72.3, 386.3 및 23.3 µg/mL인 것에 비해 연잎 추출물의 EC₅₀값은 상당히 높았지만 이는 연잎 추출물에는 항산화 성분 이외의 다양한 화합물들이 다량 함유되어 있다는 것을 감안하면 연잎 추출물의 항산화 활성은 우수한 것으로 여겨진다.

연잎 추출물의 혈장 항응고 및 α-glucosidase 저해 활성

연잎 추출물은 농도 의존적으로 혈액 응고 체계의 공통 경로를 크게 저해하였다(Fig. 2). 연잎 추출물은 3.4 mg/mL의 농도에서 외인성 경로인 PT에서 1.17배, 외인성 경로인 aPTT에서 1.08배 또한 공동경로인 TT에서 2.21배 혈장 응고를 지연시키는 것으로 나타났다. 연잎 추출물은 PT와 aPTT에서는 혈장 응고의 지연 효과가 크지 않았으나, TT에서는 높은 혈장 응고 억제 활성을 보임으로써 주로 공통 경로에서 혈액 응고를 저해함을 알 수 있었다. 혈액응고는 내인성 및 외인성 경로를 통해 Xa 인자가 활성화되고 연쇄적으로 공통경로의 thrombin 활성화에 의해 혈전이 생성됨으로써 일어난다[34]. 연잎 추출물의 혈장 응고 지연 효과는 주로 공통 경로에서 프로트롬빈의 활성화 억제 또는 트롬빈의 활성 저해에 의한 것으로 보인다. 폴리페놀 화합물이 혈장 항응고 활성을 나타낸다는 기존의 보고[23]로 보아 연잎 추출물의 항응고 활성 역시 그 추출물에 다량 함유되어 있는 폴리페놀 화합물에 기인한 것으로 여겨진다. 기존의 연구에서는 연잎의 메탄올 추출물이 62 mg/mL의 농도에서 PT를 전혀 지연시키지 않았으나 125 mg/mL 농도에서는 PT를 6.9배 지연시키는 것[35]으로 나타나 본 연구와 마찬가지로 낮은 농도의 연잎 추출물은 PT에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 또한 사자발약쑥 추출물은 3.22 mg/mL의 농도에서 TT를 1.82배 지연시킨다는 보고[28]과 비교하여도 연잎 추출물의 혈장 항응고 활성은 우수하다고 여겨진다.

연잎 추출물의 농도에 비례하여 α-glucosidase에 대한 저해 활성이 증가하였다(Fig. 3). 연잎 추출물은 68.7 µg/mL의 농도에서 α-glucosidase의 활성을 63.1% 저해하는 것으로 나타났다. 소장점막에 존재하는 당 분해효소인 α-glucosidase의 활성을 저해하면 당질류가 포도당으로 분해되는 것을 억제하여 급격한 혈당상승을 막을 수 있다[36]. 울릉도 자생식물인 섬바디의 70%

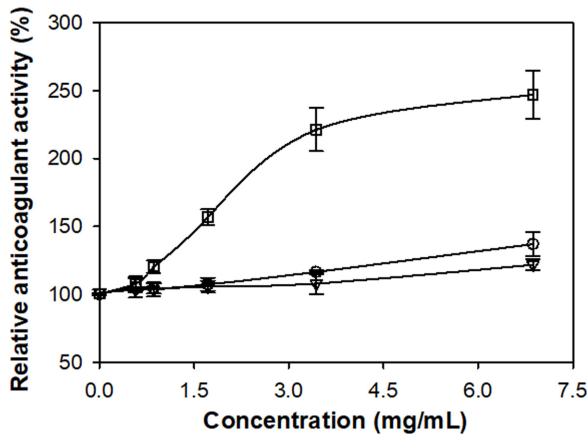


Fig. 2 Effect of 60% ethanolic extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves on plasma coagulation. Data presented the changes in TT (-□-), PT (-○-), and aPPT (-▽-) as a function of the extract concentration. Data were means and SD of triplicate measurements

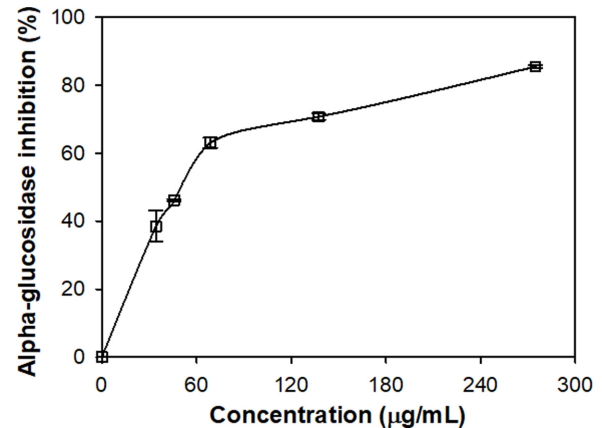


Fig. 3 Effect of 60% ethanolic extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves on α -glucosidase activity. Data were means and SD of triplicate measurements

메탄올 추출물과 생강과 식물인 핑거루트의 80% 메탄올 추출물은 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 α -glucosidase의 활성을 각각 55.9 및 60.7% 저해하였고[36,37], 사방오리나무의 메탄올 추출물은 137.4 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 50.0% 저해한다는 보고[38]와 비교해 보아도 연잎 추출물의 α -glucosidase에 대한 저해 효과는 우수한 것으로 여겨진다.

이상의 결과에서 연잎의 60% (v/v) 에탄올 수용액 추출물은 폴리페놀 화합물의 함량이 높았고, *in vitro*에서 항산화, 혈장 항응고 및 α -glucosidase 활성 저해의 우수한 생리활성을 나타내었다. 향후 연잎 추출물의 생리활성 물질을 분리하여 항산화, 항응고 및 α -glucosidase 활성 저해의 작용 메커니즘을 규명하는 연구가 필요할 것이다.

초 록

연잎(*Nelumbo nucifera*)의 60% (v/v) 에탄올 수용액 추출물의 항산화, 혈장 항응고 및 α -glucosidase 저해 효과를 *in vitro*에서 확인하였다. 연잎 추출물의 수율은 $35.3 \pm 1.1\%$ 이었고, 폴리페놀 화합물 함량은 $186.2 \pm 5.2 \mu\text{g gallic acid equivalents/mg}$ 으로 나타났다. 연잎 추출물은 농도에 비례하여 유리라디칼, 양이온라디칼 및 아질산염을 효과적으로 소거하였고 뛰어난 환원력을 보유하고 있었다. 또한 연잎 추출물은 농도 의존적으로 우수한 혈장 항응고 및 α -glucosidase 저해 활성을 나타내었다.

Keywords 연잎(*Nelumbo nucifera*) · 폴리페놀 · 항산화 · 항응고 · α -Glucosidase 저해

감사의 글 본 논문은 제1저자의 청운대학교 석사학위논문을 바탕으로 작성되었습니다.

References

- Paudel KR, Panth N (2015) Phytochemical profile and biological activity of *Nelumbo nucifera*. Evid Based Complement Alternat Med 2015: 789124. doi: 10.1155/2015/789124
- Brindha D, Arthi D (2010) Antimicrobial activity of white and pink *Nelumbo nucifera* Gaertn flowers. Asian J Pharmaceut Res Health Care 2: 147–155
- Chen X, Wang C, Chen J, Onivogui G, Song Y (2015) Antibacterial activity of lotus leaves (*Nelumbo nucifera*) against food-borne pathogens. Am J Biochem Biotechnol 11: 11–16. doi: 10.3844/ajbbsp.2014
- Yen GC, Duh PD, Su HJ (2005) Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes. Food Chem 89: 379–385. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.02.045
- Yang DM, Wang QS, Ke LQ, Jiang JM, Ying TJ (2007) Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) rhizome. Asia Pac J Clin Nutr 16: 158–163
- Du H, You JS, Zhao X, Park JY, Kim SH, Chang KJ (2010) Antiobesity and hypolipidemic effects of lotus leaf hot water extract with taurine supplementation in rats fed a high fat diet. J Biomed Sci 17: S42. doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S42
- Shin DJ, Choe J, Hwang KE, Kim CJ, Jo C (2019) Antioxidant effects of lotus (*Nelumbo nucifera*) root and leaf extracts and their application on pork patties as inhibitors of lipid oxidation, alone and in combination. Int J Food Prop 22: 383–394. doi: 10.1080/10942912.2019.1588295
- Lee SS, Imm JY, Han YS (2012) The improvement effect of lotus leaf extracts on acne skin. Kor J Aesthet Cosmetol 10: 405–413
- Lee KS, Kim MG, Lee KY (2006) Antioxidative activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. J Korean Soc Food Sci Nutr 35: 182–186. doi: 10.3746/jkfn.2006.35.2.182
- Lim JA, Lee ES, Baek SH (2008) Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of ethanol extract from *Nelumbo nucifera* leaves. J Physiol & Pathol Korean Med 22: 654–659
- Park CH, Hur JM, Song KS, Park JC (2007) Phenolic compounds from the leaves of *Nelumbo nucifera* showing DPPH radical scavenging effect. Kor J Pharmacogn 38: 263–269
- Li MY, Xu ZT (2008) Quercetin in a lotus leaves extract may be

- responsible for antibacterial activity. Arch Pharm Res 31: 640–644. doi: 10.1007/s12272-001-1206-5
13. Chang MS, Kim HM, Yang WM, Kim DR, Park EH, Ko EB, Choi MJ, Kim HY, Oh JH, Shim KJ, Yoon J, Park SK (2007) Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* on tyrosinase activity and melanogenesis in clone M-3 melanocyte cells. Kor J Herbology 22: 87–94
 14. Chang MS, Ko EB, Lee HJ, Kim JS, Kim JS, Jee SW, Kim HM, Yeom MH, Kim DH, Kim HK, Park SK (2011) The effects of *Nelumbo nucifera* on ultraviolet-B irradiated human keratinocytes. Kor J Herbology 26: 45–49. doi: 10.6116/kjh.2011.26.2.045
 15. Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem 12: 239–243. doi: 10.1016/S0021-9258(18)88697-5
 16. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol Med 26: 1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
 17. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199–1200. doi: 10.1038/1811199a0
 18. Gray JI, Dugan Jr LR (1975) Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. J Food Sci 40: 981–985. doi: 10.1111/j.1365-2621.1975.tb02248.x
 19. Oyaizu M (1985) Studies on products of browning reaction: Antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jap J Nutr 44: 307–315. doi: 10.5264/eiyogakuzashi.44.307
 20. Fox I, Dawson A, Loynds P, Eisner J, Findlen K, Levin E, Hanson D, Mant T, Wagner J, Maraganore J (1993) Anticoagulant activity of HirulogTM, a direct thrombin inhibitor, in humans. Thromb Haemost 69: 157–163. doi: 10.1055/s-0038-1651573
 21. Kim TH (2016) A novel α -glucosidase inhibitory constituent from *Uncaria gambir*. J Nat Med 70: 811–815. doi: 10.1007/s11418-016-1014-0
 22. Daglia M (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. Curr Opin Biotechnol 23: 174–181. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.007
 23. Zong S, Ji J, Li JL, Yang QH, Ye M (2017) Physicochemical properties and anticoagulant activity of polyphenols derived from *Lachnum singerianum*. J Food Drug Anal 25: 837–844. doi: 10.1016/j.jfda.2016.08.011
 24. Arnous A, Makris DP, Kefalas P (2001) Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. J Agric Food Chem 49: 5736–5742. doi: 10.1021/jf010827s
 25. Ahn SM, Sung HJ, Kim JS, Park JY, Sohn HY (2018) Anti-thrombotic activities of hot-water extracts prepared from various parts of *Nelumbo nucifera* Gaertner. J Life Sci 28: 1156–1162. doi: 10.5352/JLS.2018.28.10.1156
 26. Kim C, In MJ, Kim DC (2015) *In vitro* antioxidant activity of ethanol extract from *Boehmeria nivea* L. leaves. Food Eng Prog 19: 76–81. doi: 10.13050/foodengprog.2015.19.1.76
 27. Kim DC (2020) Antioxidative activities of ethanolic extracts of *Du-zhong* (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaf and bark. J Appl Biol Chem 63: 259–265. doi: 10.3839/jabc.2020.035
 28. In MJ, Kim KH, Kim DC (2020) Antioxidant and anticoagulant activities of Ganghwa medicinal mugwort (*Artemisia princeps* Pampanini) extract. J Appl Biol Chem 63: 439–442. doi: 10.3839/jabc.2020.057
 29. Jeong CH, Kang ST, Joo OS, Lee SC, Shin YH, Shim KH, Cho SH, Choi SG, Heo HJ (2009) Phenolic content, antioxidant effect and acetylcholinesterase inhibitory activity of Korean commercial green, puer, oolong, and black teas. Korean J Food Preserv 16: 230–237
 30. Yen GC, Chen HY (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J Agric Food Chem 43: 27–32. doi: 10.1021/jf00049a007
 31. Mirvish SS (1995) Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposure to NOC. Cancer Lett 93: 17–48. doi: 10.1016/0304-3835(95)03786-V
 32. Park HM, Hong JH (2014) Effect of extraction methods on antioxidant activities of *Mori ramulus*. J Korean Soc Food Sci Nutr 43: 1709–1715. doi: 10.3746/jkfn.2014.43.11.1709
 33. Jun HI, Kim YA, Kim YS (2014) Antioxidant activities of *Rubus coreanus* Miquel and *Morus alba* L. fruits. Korean Soc Food Sci Nutr 43: 381–388. doi: 10.3746/jkfn.2014.43.3.381
 34. Nishino T, Nagumo T (1992) Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. Carbohydr Res 229: 355–362. doi: 10.1016/s0008-6215(00)90581-0
 35. Ramya D, Thirunavukkarasu P, Barathi A, Asha S (2017) *In vitro* anticoagulant activity of *Nelumbo nucifera* leaf extracts on normal healthy blood plasma. Int J Green Pharm 11: 166–170. doi: 10.22377/ijgp.v11i03.1121
 36. Kim JH, Jeong GH, Jeong YH, Kim TH (2019) Free radical scavenging and α -glucosidase inhibitory activities of the extracts of *Dystaenia takesimana* from Ulleung island. Korean J Food Preserv 26: 246–252. doi: 10.11002/kjfp.2019.26.2.246
 37. Jeong GH, Jeong YH, Kim TH (2020) Comparison of the radical scavenging and α -glucosidase inhibitory activities of fingerroot extracts based on different extraction methods. Korean J Food Preserv 27: 197–203. doi: 10.11002/kjfp.2020.27.2.197
 38. Choi HJ, Jeong YK, Kang DO, Joo WH (2008) Inhibitory effects of four solvent fractions of *Alnus firma* on α -amylase and α -glucosidase. J Life Sci 18: 1005–1010. doi: 10.5352/JLS.2008.18.7.1005